

## セービンワクチンウイルスの凍結乾燥に関する研究

### 第1報. 凍結乾燥に関する基礎的条件の検討

塩 見 洋 浦 沢 价 子 浦 沢 正 三

札幌医科大学医学部衛生学講座 (主任 浦沢正三 教授)

### Studies on Lyophilization of Sabin Vaccine

#### 1. Investigation on Fundamental Conditions for Lyophilization

Hiroshi SHIOMI, Tomoko URASAWA and Shozo URASAWA

Department of Hygiene, Sapporo Medical University School of Medicine

(Chief: Prof. S. URASAWA)

**ABSTRACT** The development of a heat-stable poliovaccine preparation is urgently needed for the eradication of polio in tropical countries. In the present study, in order to obtain heat-stable lyophilized poliovaccine (type 1, 2 and 3 Sabin strains), conditions affecting the lyophilization of the vaccine viruses were studied. With regard to lyophilizing medium (medium used for suspending virus before lyophilization), the effect of a single chemical component, and double and tripple chemical components on lyophilization and subsequent incubation at 37°C or 45°C was examined stepwise. The composition of reconstituting medium (medium used for suspending the lyophilized virus) was also examined in a similar manner. The results suggested excellent effects of a combined medium consisting of 2.5% sorbitol, 0.06%-0.1% glutamine (or arginine) and 0.01% BSA for lyophilization and a medium composed of 5%-10% polypeptone S and 10%-15% sucrose for reconstitution. An attempt to select a vaccine virus variant which is resistant to lyophilization by means of repeated lyophilization followed by multiplication in cell cultures was unsuccessful.

(Received August 29, 1997 and accepted September 18, 1997)

**Key words:** Sabine vaccine, Lyophilization, Medium component

#### 1 緒 言

世界保健機構 (WHO) は、天然痘の根絶に続いて、小児麻痺 (ポリオ)、麻疹、ジフテリア、百日咳、破傷風、および結核の6感染症の制圧を目指し、UNICEF等の協力機関と共同で1974年予防接種拡大計画 (Expanded Programme on Immunization: EPI) を開始した。当時、先進諸国ではこれらのワクチンの接種率は80%以上と高かったのに対して、発展途上国では極めて低率でこれらの感染症による乳幼児死亡が多発していた<sup>1)</sup>。野生型ポリオウイルスは今日、わが国を含め先進諸国においてほぼ根絶状態にある。生ポリオワクチン (セービンワクチン<sup>2,3)</sup>) の効果は、本邦における1961年の本ワクチンの緊急投与によりポリオ患者

の発生が激減し、以来ポリオの流行が姿を消した事実により世界的によく知られている<sup>4)</sup>。予防接種拡大計画の実施にも拘わらず、熱帯地方の多くの発展途上国においてポリオ患者の発生はいまだ跡を絶たない。近年、南アメリカ、東地中海、西太平洋地域においては麻痺性ポリオ患者の発生は明らかな減少傾向を示し、特に南北米大陸では1991年以来患者発生の報告はない。一方、WHOの1988年の統計によると、アフリカおよび東南アジアでは届出患者数は人口10万人あたり1~2例を数え、この数は1974年からの14年間さほどの減少が見られず、世界の中でも今後ワクチン投与の必要な地域として残されている<sup>1)</sup>。WHOは1988年5月の第41回総会で西暦2000年までのポリオの根絶を目指した決議を採択した<sup>5)</sup>が、この実現には徹底したサーベイラ

ンスとワクチン接種が二本の柱になると考えられる。現行の生ポリオワクチン（セービン株）は最も易熱性のワクチンの1つとして知られており<sup>6)</sup>、コールドチェーン（cold chain）の不備な発展途上国におけるポリオ予防接種計画の遂行<sup>7)</sup>のためには、熱帯地方において安定な耐熱性ワクチンの開発が緊急かつ重要な検討課題となっている<sup>1)</sup>。

ワクチン自体の耐熱性を高める手段としては、現行のセービンワクチンの製造過程に工夫を加え耐熱性を付与する方法と、セービン株よりも耐熱性に富み、かつ安全性の確認されたウイルス株を確立する方法とが考えられる。前者の方法は、現在世界各国で製造されているセービンワクチンに採用されている。すなわち、ウイルス溶解液への高濃度（35～70%）の蔗糖の添加、あるいは50°C 1時間加熱に対し抵抗性を高めることが知られている高濃度（1 mol）の2価マグネシウムイオン（ $Mg^{2+}$ ）の添加により、2～8°Cでの長期間の保存に対する抵抗性を賦与している<sup>8)</sup>。しかしこれらの方法は熱帯地方でより高温の環境（35°C以上）に長期間曝露された際の感染価の著しい低下を抑えることはできない。近年のポリオウイルスの構造の解明に伴い、ウイルス表面蛋白のhydrophobic pocketを保護して耐熱性を高める研究もなされているが<sup>9)</sup>、未だ実用の域に達していない。

これに対して、ワクチンを凍結乾燥（以下凍乾と省略）することによって耐熱性を付与する試みは、これまで他のいくつかのウイルスでは成功し、麻疹、ムンプスあるいは風疹ウイルスなどでは現在広く実用に供されている<sup>10,11)</sup>。しかし、エンベロープを持たないエンテロウイルスの凍乾は経済的に困難であると考えられており、ポリオウイルスの凍乾に関しては強毒株ウイルスおよび不活化ワクチンについての報告<sup>12,13)</sup>があるのみで、生ワクチンについては全く行われていない。その後も、水分がポリオウイルスのカプシド蛋白の構造保持に不可欠であるという考えもあり、凍結乾燥が試みられないまま現在に至っている。このように予想される技術的な難しさにもかかわらず、WHOはポリオの根絶計画開始以来ポリオワクチンの凍乾の再検討の必要性を指摘している<sup>1)</sup>。

われわれは1989年から、耐熱性ポリオワクチンの開発研究班（厚生省依頼事業、責任者：日本ポリオ研究所理事長 橋爪 壮）の一員として、従来ポリオワクチンの耐熱性に関して定められていた基準（37°C 1週間保存後の感染力価の低下を0.5 log<sub>10</sub>以内とする）を充たすワクチンの開発のために、現行セービン生ポリ

オワクチンの凍乾を試みて来た。本報では凍乾による感染価の低下を最小にとどめ、かつ凍乾ウイルスの高温保存に耐える条件の検討を行い、次報では本報で設定された条件による凍乾とその後の長期保存によるウイルス力価の正確な測定を行い、ポリオワクチンの耐熱化における凍乾法の意義について検討した。

## 2 方 法

### 2.1 使用ウイルスとウイルス溶解液

本研究に使用されたセービン1型、2型、3型ワクチンウイルスは、いずれも日本ポリオ研究所から供与を受けた。これらはセービン・オリジナル・ウイルス（SO）を初代サル腎細胞で1回増殖させたWHOマスター・シード（SO+1）を日本ポリオ研究所にて1代培養したマニファクチャラーズ・ワーキング・シード（SO+2）からさらに1代培養したもの（SO+3）である<sup>14)</sup>。供与を受けたウイルスは試験管に分注し、使用に際して一部ずつ溶解して凍乾などの実験に供した。種々のウイルス溶解液（凍乾前ウイルス溶解液）の効果の比較実験に際しては、溶解液0.5 mlに対して1/100量のウイルス原液（上記SO+3）を加えて実験を行った。なおウイルス溶解液を構成する各種物質の濃度は%濃度（重量g/容量ml）を以て示した。

### 2.2 凍結乾燥

凍結乾燥にはエドワーズ真空凍結乾燥装置（モデュリオEF-4、棚1段式バルクチャンバーX-1）及び油回転式真空ポンプ（エドワーズE2M5）を使用した。1次凍乾は-45°Cで3日間、2次凍乾は-5°Cで2日間行った。サンプルに由来するガス状の水分子を捕促するトラップの温度は-65°Cに設定し、真空度は $6.0 \times 10^{-2}$  mbar以下に保った。

### 2.3 加熱保存試験

凍乾後、減圧状態の下で各バイアルにゴム栓を施した後、常圧中に取り出しアルミキャップにて密栓した。10数個ずつを褐色瓶に入れ、これを37°Cあるいは45°Cの各恒温槽に浸して所定の期間加熱した。加熱の終了したサンプルは感染価の測定直前に溶解液に戻すまで-30°C以下で保存した。

### 2.4 凍乾後ウイルス溶解液

凍乾直後もしくは所定の期間加熱後のサンプル中のウイルス感染価を知るために、上述の-30°C以下に保存されたサンプルを再蒸留水および種々の溶液（凍乾後ウイルス溶解液）中に溶解し、感染価の測定を行った。

## 2・5 ウイルス感染価の測定

6穴のプレート (Falcon, 3046 multiwell tissue culture plate, 各 well 直径 3.5 cm) 上に単層培養した GMK2 細胞 (established green monkey kidney cells) を用い、プラークアッセイにて感染価を測定した<sup>15)</sup>。ウイルス 1 希釈あたり 2 穴以上の細胞に各 0.1 ml づつ接種し、1 時間の吸着の後、型の如く各穴 2.0 ml の 1.1% Bactoagar (Difco Laboratory) 培養液 (一次重層) を、その 2 日後に 1.0 ml の neutral red を含む寒天で 2 次重層を行った。凍乾ウイルス液の GMK 細胞への接種は、凍乾標品を凍乾後溶解液で溶解直後に行った。2 次重層の翌日 (接種の 3 日後) に出現したプラーク数を数え、plaque forming unit (PFU)/0.1 ml の対数値で感染価を表した。

## 3 成績

### 3・1 各種の予備的実験条件の検討

凍乾の際のウイルス溶解液 (凍乾前ウイルス溶解液) の組成の比較検討を行うために、一応の凍乾条件および凍乾後のウイルス溶解液の組成を以下のように設定した。

#### 3・1・1 凍乾の物理的条件の検討

バイアル当たり 0.5 ml 分注された凍乾前のサンプルは通常 -80°C のフリーザーで予め凍結するか、あるいはサンプルを予め冷却しておいた凍乾機棚板上で一晩凍結した後、凍乾の操作に入った。トラップの温度は -65°C に設定し、真空度は凍乾の全過程を通じて  $6.0 \times 10^{-2}$  mbar 以下に保った。乾燥は、当初棚板温度を -45°C に設定して 3 日間行ったが、これではセービン各型ウイルスともその感染価がほぼ  $1/10^4$  に失活したため条件を変更し、棚板温度を -45°C に設定し (実測温度は -42 ~ -38°C の範囲で変動した) 3 日間 (1 次凍乾)、次いで棚板温度を -5°C に設定し (実測温度は -6 ~ +4°C) さらに 2 日間の凍乾 (2 次凍乾) を行った。1 次及び 2 次凍乾の組み合わせにより、凍乾によるセービン各型ウイルス感染価の低下は  $1/10^{1.5 \sim 2.5}$  程度に留まった。2 次凍乾の温度条件として -5°C と +5°C の比較を行った結果、明瞭な差は認められなかったが、念のためより低温条件の -5°C で 2 日間とした。

#### 3・1・2 凍乾後溶解条件の暫定的設定

凍乾後ウイルスの溶解については、再蒸留水を用いて凍乾前の状態に復元させるという方法があるが、一方では緩衝作用のある溶液を用いて凍乾により物理的に損傷を受けたウイルスのその後の感染価の保持を計るという考え方がある<sup>12)</sup>。このような考え方に基いて、

本研究の後半で凍乾後ウイルス溶解液の検討を行うまでは、再蒸留水およびバクトカシトン (ワクチンの安定剤として使用されるペプトンの 1 種) の 10% 溶液を凍乾後ウイルス溶解液として使用した。

#### 3・1・3 凍乾後ウイルスの保存温度

ポリオ生ワクチンの耐熱化については、従来「37°C 1 週間加熱保存後、感染価の低下を  $0.5 \log_{10}$  に収めること」が一応の基準であったが、より理想的条件として子供ワクチン会議 (Children's Vaccine Initiative, 1991 年 6 月, ジュネーブ) は「45°C 1 週間加熱保存後、感染価の低下を  $0.5 \log_{10}$  に収めること」という目標を提案した<sup>16)</sup>。これに対応して、本研究では、37°C での加熱試験に加えて 45°C での加熱試験を行い、凍乾ウイルスの保存について検討した。

### 3・2 凍乾前ウイルス溶解液の検討

#### 3・2・1 凍乾前ウイルス溶解液の基材の検討—凍乾前と凍乾後および凍乾ウイルスの加熱後の感染価の比較

凍乾前ウイルス溶解液の基材として用いる物質を選出するためにマンニトール、マルチトール、ラクチトール、ソルビトール、グルコース (それぞれ 40% ~ 0.5%), 蔗糖 (40% ~ 10%), ラクトース (40% ~ 2.5%), フィコール (40% ~ 2.5%), イーグル MEM 用アミノ酸・ビタミン (20% ~ 1%), グルタミン (1.5% ~ 0.094%),  $MgCl_2$  (5 mol ~ 0.3 mol), 燐酸尿素 (40% ~ 2.5%), ゼラチン (2% ~ 0.05%), ヘマセル (3% ~ 0.25%), ウシ血清アルブミン (BSA: 3% ~ 0.05%), ウシ胎児血清 (FCS: 20% ~ 1%), ポリペプトン (10%), ポリペプトン S (10%), バクトカシトン (10%), L- $\alpha$  フォスファティディルコリン (0.5% ~ 0.004%), レシチン (0.5% ~ 0.004%), トレハロース (4% ~ 0.5%) のそれぞれ (%) はいずれも weight/volume) 0.5 ml に 1/100 容のセービン 1 型ウイルスを溶解し (溶解後の感染価  $4.4 \log_{10}$  PFU/0.1 ml), 凍乾を行い、比較的良好な結果が得られた物質の凍乾後の感染価を対数値で Table 1 に示した。

これらのうち、凍乾による感染価の低下がほぼ  $1 \log_{10}$  程度に収まる結果が得られた糖類 4 種類と Eagle MEM 培地 (日水) 用のアミノ酸・ビタミンについて、水による溶解が容易な 10% ~ 0.5% の濃度でウイルス溶解液を作成し (溶解液の感染価  $4.67 \log_{10}$  PFU/0.1 ml), 凍乾直後および凍乾ウイルスを 37°C 1 週間加熱した後の感染価を測定した (Table 2)。いずれの溶解液でも凍乾による感染価の低下は Table 1 の成績と略同様であったが、その後の 37°C 1 週間の加熱によりかなりの

**Table 1** Lyophilization of Sabin type 1 virus suspended in various media at different concentrations

medium	40%	30%	20%	10%	5%	2.5%	1%	0.5%
mannitol	i. s.**	3.49	3.65	3.15	3.46	3.26	3.41	2.80
		3.40	3.53	3.65	4.08	3.68	3.86	2.40
		3.40	3.53	3.80	3.78		3.56	
maltitol	4.36* 3.51*	4.28*	2.95	2.38	1.40	1.40	<1.0	<1.0
		2.51*	3.11	4.08	2.72	2.48	<1.0	2.51
				3.61				
lactitol	1.79	1.90	1.00	2.08	1.60	1.18	1.18	1.85
sorbitol	3.04	3.23	3.08	3.48	2.04	3.85	3.23	2.60
	3.34	3.45	3.26	3.38	2.90	3.23		
				3.53				
glucose	3.23	3.00	2.88	2.00	2.38	3.00	2.11	2.48
				3.45	2.70			
				3.52				
sucrose	3.08*	3.11*	2.32*	2.76				
lactose	i. s.	i. s.	i. s.	2.51	1.30	<1.0		
amino acid・vitamine***			i. s.	i. s.	i. s.	i. s.	2.93	
							3.38	

	1.50%	0.75%	0.375%	0.188%	0.094%
L-glutamine	2.46	1.85	2.08	2.38	2.08
	5.0M	2.5M	1.25M	0.625M	0.313M
MgCl <sub>2</sub>	1.00	1.18	1.00	2.18	2.65

Sabin type 1 virus having GMT (geometric mean titer based on three different titrations) of  $4.4 \log_{10}$  PFU/0.1 ml was subjected to lyophilization. Lyophilized virus was reconstituted with doubly distilled water (DDW). Numerals in the table show virus titers ( $\log_{10}$  PFU/0.1 ml) after lyophilization.

\* Samples failed to be lyophilized (they were viscous after lyophilization treatment).

\*\* Medium insoluble at indicated concentrations.

\*\*\* Powdered amino acid・vitamine mixture for Eagle's MEM (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd. Tokyo, Japan)

低下が認められた。最も好成績を示した2.5%ソルビトールで凍乾前に比しほぼ  $10^{2.5}$  の、それ以外では  $10^3$  以上の力価の低下が見られた。

### 3・2・2 2剤の混合による凍乾前ウイルス溶解液の検討

以上の結果より、単一の物質を用いる凍乾前ウイルス溶解液では、加熱時の感染価の低下を防ぐことは困難であると考えられたため、Table 2 を含め繰り返し行った類似の実験を通じて比較的凍乾後の感染価が安定して高かった糖類ソルビトールおよびマンニトールに、

**Table 2** Effect of selected lyophilizing media on lyophilization and subsequent incubation (at 37°C for 1 week) of Sabin type 1 virus.

medium	virus titer ( $\log_{10}$ PFU/0.1 ml) at				
	10%	5%	2.5%	1%	0.5%
glucose	3.56*	2.48	2.88	2.11	2.57
	1.70*	1.00	1.00	<1.0	<1.0
sorbitol	3.43	2.40	3.85	2.48	2.00
	1.30	<1.0	2.23	<1.0	<1.0
mannitol	2.73	3.90	3.70	2.64	2.54
	<1.0	1.85	1.30	<1.0	<1.0
maltitol	3.66	2.78	2.36	1.85	2.53
	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
amino acid・vitamine				3.48	3.32
				1.48	<1.0

Sabin type 1 virus having GMT of  $4.67 \log_{10}$  PFU/0.1 ml was lyophilized and was reconstituted with DDW.

\* Numerator and denominator indicate virus titer before (soon after lyophilization) and after the incubation at 37°C for 1 week, respectively.

Eagle MEM 用アミノ酸・ビタミンを組み合わせた2剤混合溶解液を作成して同様の検討を行った。

ソルビトール濃度を2.5%に固定し、アミノ酸・ビタミン濃度(5%~0.0037%)を変えた実験では、0.12%~0.0075%の濃度においてソルビトール単体に比してウイルス感染価の低下は少なくなったが、0.06%での低下が最も少なく、凍乾とその後の37°C7日加熱による感染価の低下は約  $1.7 \log_{10}$  PFU/0.1 ml であった。アミノ酸・ビタミン濃度を0.06%に固定し、ソルビトールの濃度(10%~1%)を検討した結果でも、2.5%での感染価の保持が最も良好であることが確認された(図表省略)。ソルビトールに次いで好成績が得られたマンニトール(20%~0.5%)とアミノ酸・ビタミン(5%~0.004%)との混合溶解液を用いて類似の実験を行ったが、37°C7日後の感染価は全て  $2.5 \log_{10}$  PFU/0.1 ml 以上の低下が認められた(表省略)。

ここで使用したEagle MEM用アミノ酸・ビタミンには各種のアミノ酸およびビタミン類が含まれている。そこでこの構成成分中に存在しソルビトールとの相乗効果を有する物質を特定するため、ソルビトール(2.5%)に加え主なアミノ酸10種類とイノシトールのいずれか(0.06%)の混合液を用いてウイルス溶解液を作成し、凍乾と37°C7日の加熱試験を行った。同時に、ウイル

スの保存に効果的とされるその他 21 種の物質(ペプトン類,  $Mg^{2+}$  類, 糖類, その他塩類溶液など)についても同様に検討し, 比較的良好な成績が得られたものを Table 3 に示した。結果は, グルタミン, グリシン, BSA の添加による効果が最も大きく, 次いで NaCl, KCl, スレオニン, アルギニンについてもある程度の効果を期待させる成績であった。

そこで, グルタミン(0.03%~0.12%), アルギニン(0.03%~0.18%), スレオニン(0.0125%~0.4%), グリシン(0.0125%~0.4%), BSA(0.03%~0.4%), NaCl(0.03%~0.18%), KCl(0.03%~0.18%),  $MgCl_2$ (0.01%~0.25%) および  $MgSO_4$ (0.01%~0.75%) について, それぞれに示した濃度とソルビトールの 1.5%, 2.5% および 5% とを組み合わせた凍乾前ウイルス溶解液を作成しセービン 1 型ウイルスを

**Table 3** Effect of lyophilizing media (sorbitol plus one) on lyophilization and subsequent 37°C incubation of Sabin type 1 virus.

medium										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
4.60*	4.10	3.82	4.10	3.82	3.42	3.42	5.00	4.30	4.20	4.10
3.50*	<2.8	<2.8	2.80	<2.8	<2.8	<2.8	4.00	3.82	3.10	3.10
medium										
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
5.60	3.70	3.90	5.00	3.30	4.10	5.30	5.25	5.00	4.50	4.30
<2.8	<2.8	<2.8	4.00	<2.8	<2.8	3.00	3.30	3.30	<2.8	2.70
medium										
23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
4.38	4.30	4.78	3.12	4.46	5.00	4.30	<2.8	4.30	4.40	
2.80	<2.8	<2.8	<2.8	<2.8	<2.8	<2.8	<2.8	<2.8	3.00	

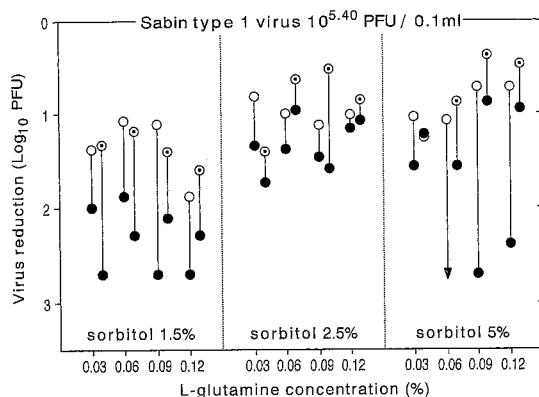
Sabin type 1 virus having GMT of  $5.6 \log_{10}$  PFU/0.1 ml, which was dissolved in a mixture of sorbitol (2.5%) and one of the following chemicals (0.06%) was lyophilized.

- 1: Threonine 2: Histidine 3: Isoleucine 4: Valine
  - 5: Methionine 6: Phenylalanine 7: Tryptophane
  - 8: Glutamine 9: Glycine 10: Arginine 11: Inositol
  - 12: Bactopeptone 13: Polypeptone 14: Polypeptone-S
  - 15: BSA 16: Na Carboxymethyl Cellulose
  - 17: Polyethylene Glycol 18: Na Dextran Sulphate
  - 19: NaCl 20: KCL 21:  $Na_2HPO_4$  22:  $MgSO_4$
  - 23:  $MgCl_2$  24: Na Acetate 25:  $NH_4$  Acetate
  - 26:  $NaH_2PO_4$  27: NaI 28:  $Na_2SO_4$  29:  $Na_2CO_3$
  - 30: Citric Acid 31: Na Citrate 32: Sucrose
- DDW was used for reconstitution. Numerals in the table show virus titers.

\* Numerator and denominator indicate virus titer before and after the incubation at 37°C for 1 week, respectively

溶解した(ウイルス感染価は  $5.0 \sim 5.6 \log_{10}$  PFU/0.1 ml). それらを凍乾し, 凍乾試料の一部に 37°C一週間の加熱試験を行い, それぞれ処理後のウイルスを再蒸留水または 10%バクトカシトンで復元溶解して感染価を測定した。結果は凍乾前のウイルス感染価に対する凍乾後の感染価の低下率( $\log_{10}$  PFU reduction) (白マル印) および凍乾ウイルスの 37°C 1 週間加熱後の低下率 (黒マル印) で示し, それぞれの実験毎にウイルス溶解液が蒸留水の場合 (左側縦線) とバクトカシトンの場合 (右側縦線) を区別した (Fig. 1 および Fig. 2)。

グルタミン (Fig. 1) は, 0.06%~0.09%において, 3 種のソルビトール濃度を通して凍乾および凍乾ウイルスの加熱による感染価の保存が比較的良好であった。凍乾後ウイルス溶解液としては, 全体を通して再蒸留水に比してバクトカシトンが優れていることが明らかであった。Fig. 2 にアルギニン, スレオニン, グリシンおよび BSA についての結果を示す。スレオニン (Fig. 2b), およびグリシン (Fig. 2c) についてはソルビトール 2.5% 濃度で 0.05%~0.2% の範囲で, アルギニン (Fig. 2a) および BSA (Fig. 2d) については, 同様ソルビトール



**Fig. 1** Effect of combined lyophilizing media (mixed solutions of sorbitol and L-glutamine) on lyophilization and subsequent 37°C incubation of Sabin type 1 virus.

Results are shown by the two vertical lines on each indicated concentration of glutamine and sorbitol. The left line indicates titer of lyophilized virus reconstituted with double distilled water (DDW) obtained before (○) and after 37°C incubation for 1 week (●). The right line indicates titer of lyophilized virus reconstituted with 10% bactocason (BC) obtained before (⊙) and after 37°C incubation for 1 week (●). Titer of Sabin type 1 virus before lyophilization is shown at the top of the figure. Infectivity reduction greater than the indicated value is shown by arrow-head (▼).

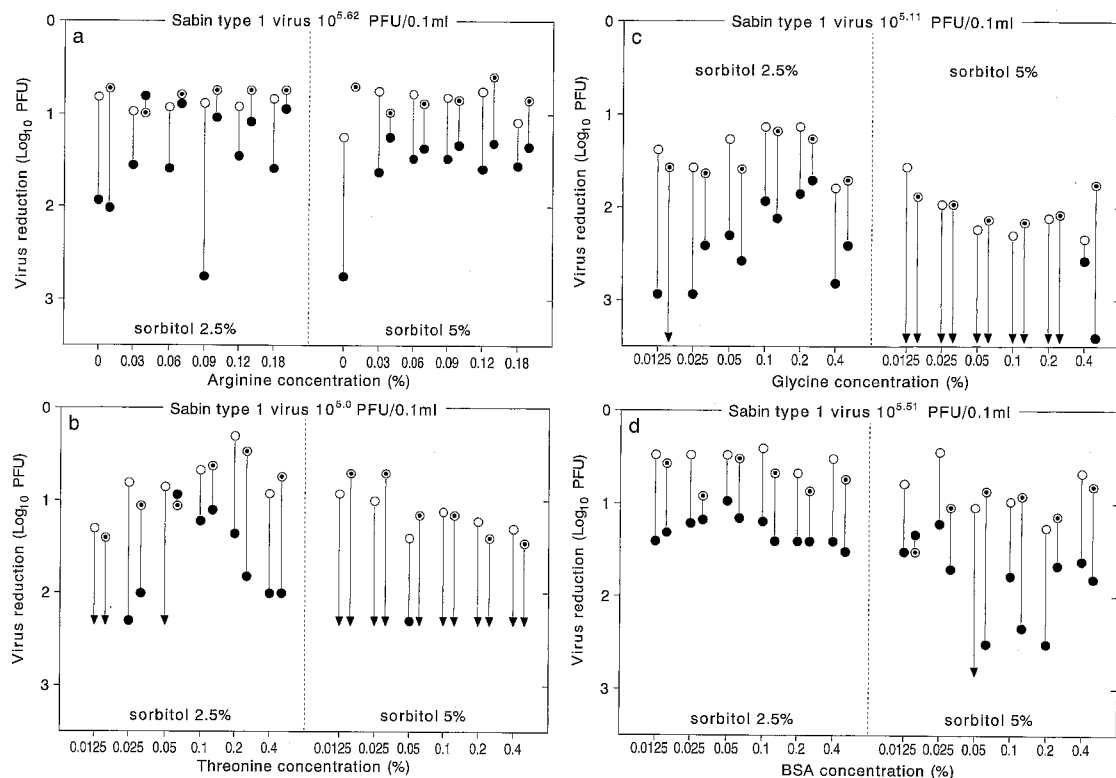


Fig. 2 Effect of combined lyophilizing media, sorbitol + arginine (a), sorbitol + threonine (b), sorbitol + glycine (c), and sorbitol + BSA (d), on lyophilization and subsequent 37°C incubation of Sabin type 1 virus. The legends are the same as those to Fig. 1. Titers of Sabin type 1 virus before each lyophilization treatment are shown at the top of each figure.

2.5%濃度で、さらに広い濃度範囲で凍乾および加熱保存による力価減少を阻止する効果が認められた。これらの実験を通じ、全体としてソルビトール濃度は前実験同様、2.5%が5.0%に比し優れていることが確認された。NaCl, KClについては明らかな相乗効果はなくソルビトール単独と変わらなかった(成績省略)。ウイルス懸濁液の加熱(50°C)に際しての安定剤として知られる $Mg^{2+}$ ( $MgCl_2$ 又は $MgSO_4$  0.01~0.25%)<sup>17)</sup>についても検討を行ったが耐熱性の向上は認められず、加えて0.5%以上の濃度では吸水性が強く、事実上凍乾不能であった。

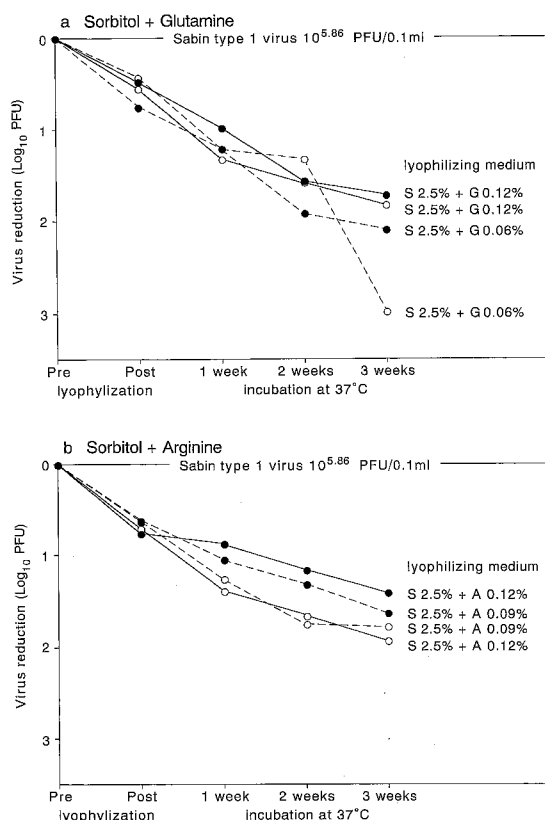
### 3・2・3 2剤混合凍乾前ウイルス溶解液が凍乾と長期加熱保存に与える効果

2剤の混合による凍乾前ウイルス溶解液の効果をより正確に把握するために、ソルビトール2.5%を基材としてグルタミンあるいはアルギニンを微量加えた凍乾前溶解液を用いてセビン1型ウイルスを凍乾し、凍乾ウイルスを37°Cで1~3週間加熱した後に、再蒸留水と

10%バクトカシトン液で再構成し感染価を測定した。その結果を凍乾前のウイルス感染価と各処理段階での感染価の差( $\log_{10}$  PFU reduction)で表しFig. 3に示した。グルタミンを加えた実験(Fig. 3a)では、凍乾とその後の37°C 1, 2, および3週間加熱で、グルタミンの何れの濃度でもほぼ直線的に感染価が低下していた。アルギニン(Fig. 3b)では、凍乾後の感染価はグルタミンより若干劣るが、その後の低下率はむしろ少なかった。凍乾後のウイルス溶解液としては、前項(3・2・2)同様蒸留水に比し10%バクトカシトンが優れていることが再確認された。

### 3・2・4 3剤以上の混合液についての検討

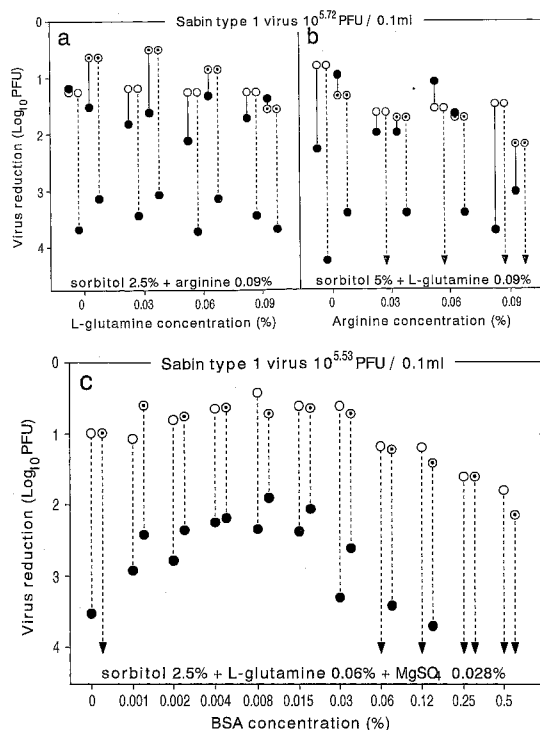
ソルビトールにグルタミンかアルギニンを加えた上記の2剤混合溶解液に、さらに3剤目以上の添加の効果を検討した。上記の成績から、耐熱性の評価には凍乾ウイルスの37°Cにおける長期間の保存効果の観察に基づく総合評価の重要性が示唆されたが、効果の最終判定に長期間を要すること、および本ワクチンに対



**Fig. 3** Effect of combined lyophilizing media, sorbitol + glutamine (a) and sorbitol + arginine (b), on lyophilization and subsequent 37°C incubation for 1-3 weeks of Sabin type 1 virus. The infectivity reduction of lyophilized viruses reconstituted with DDW (○) and 10% BC (●) are shown.

するより高温下での耐熱性賦与への WHO の要望を考慮して、37°C 3 週間の加熱試験に代わり、不活化の程度の差がより明瞭に現れる 45°C 1 週間での加熱試験を加えた。凍乾の後、45°C 1 週間の加熱を基本とし、時に 37°C 1 週間の加熱と合わせて実験を行った。

3 剤目の追加効果を見るために、ソルビトール (2.5% および 5%) を基材にグルタミン又はアルギニン (2 剤目) を 0.09% 添加し、さらに 2 剤目に含まれない両アミノ酸の何れかを濃度 0.03%~0.09% に加えた溶解液を作成し、セービン 1 型ウイルスの耐熱効果を検討した (Fig. 4a)。その結果、凍乾後及び凍乾ウイルスの加熱後の溶解液として 10% バクトカシトン使用時の実験結果 (Fig. 4a 及び b) に見るように、2 種のアミノ酸の添加による耐熱性への相加的効果は認められなかった。



**Fig. 4** Effect of combined lyophilizing media, sorbitol + arginine + glutamine (varying concentrations) (a), sorbitol + glutamine + arginine (varying concentrations) (b), and sorbitol + glutamine +  $MgSO_4$  + BSA (varying concentrations) (c), on lyophilization and subsequent incubation of Sabin type 1 virus. Titers of lyophilized virus treated under four different conditions are shown for each concentration of glutamine, arginine or BSA on abscissa. The four different treatments, from left to right in Fig. 4a and b, are i) reconstitution with DDW before and after 37°C incubation for 1 week, ii) reconstitution with DDW before and after 45°C incubation for 1 week, iii) reconstitution with 10% BC before and after 37°C incubation for 1 week and iv) reconstitution with 10% BC before and after 45°C incubation for 1 week. Virus titers before (○ or ⊙) and after the incubation (●) in each treatment are shown. Solid lines indicate the reduction in virus titer by 37°C incubation and dotted lines the reduction by 45°C incubation.

ソルビトール 2.5% と各濃度 (0.06%~0.09%) のグルタミンにアミノ酸以外の第 3 剤目として  $MgSO_4$  (0.009%~0.22%) を加えて同様に検討したが、耐熱性に変化は認められなかった。この組合せにさらに BSA を加えた結果、BSA 濃度 0.004%~0.015% の範囲で耐熱性の向上が見られた (Fig. 4c)。本溶解液中の

MgSO<sub>4</sub> の存在は実験結果に大きく影響しないと推定されたため、セービン1型に対する凍乾前ウイルス溶解液として、ソルビトール2.5%、グルタミン(又はアルギニン)0.06%~0.1%、BSA 0.01%の3剤混合液が最良と判断された。

### 3・2・5 セービン3型ウイルスに対する凍乾前ウイルス溶解液の検討

これまでの実験で見出されたセービン1型ウイルスに相当と考えられた凍乾前ウイルス溶解液について、セービン3型ウイルスに対する有効性を検討した。ソルビトール、アミノ酸(グルタミン又はアルギニン)、BSAの各種濃度について検討した結果(MgSO<sub>4</sub>の存在は殆ど結果に影響がない)、ソルビトールについては、2.0%~3.5%の範囲でセービン1型と同様に凍乾過程および45°C加熱保存に対して最も感染価の保持が良好であった(Fig. 5a)。3剤混合ワクチンとして使用されるセービンワクチンの特性を考慮し、ソルビトール濃度は1型ウイルス同様2.5%とし、次いでアミノ酸及びBSAについて至適濃度の検討を行った。

グルタミンおよびアルギニンではそれぞれ0.06%~0.16%、BSAについては0.001%~0.01%の範囲が感染価の保持に有効であった(Fig. 5b, c)。なお、種々の濃度(0.001%~0.1%)のMgSO<sub>4</sub>を用いてマグネシウムイオンの効果を検討したが、添加による明らかな効果は認められなかった。以上の結果から、セービン3型ウイルスの凍乾前溶解液も、セービン1型ウイルスと同様ソルビトール2.5%、グルタミン(又はアルギニン)0.06%~0.1%、BSA 0.01%の混合液が最良と考えられた。

なお本溶解液(pH 6.4)にNaOHまたはHClを添加して溶解液のpHを6.0~7.4に調整し、セービン3型ウイルスの凍乾および加熱保存試験を行ったが、中性付近のpH 6.4~7.0でやや良好であったため、pHの調整はとくに行わないで使用した。

### 3・3 凍乾後ウイルス溶解液の検討

セービン1型ウイルス及びより易熱性のセービン3型ウイルスを用いて、凍乾前ウイルス溶解液の組成を決定したが、その際に凍乾後のウイルス溶解液としては、とりあえず再蒸留水および10%バクトカシトンの2種を用いてきた。そこで以下に改めて、凍乾後のウイルス溶解液の組成について検討を行った。

#### 3・3・1 セービン1型および3型ウイルスに対する凍乾後ウイルス溶解液の作成

以上の実験で選択された凍乾前ウイルス溶解液を用いて凍乾およびその後の45°C 1週間の加熱を行ったセー

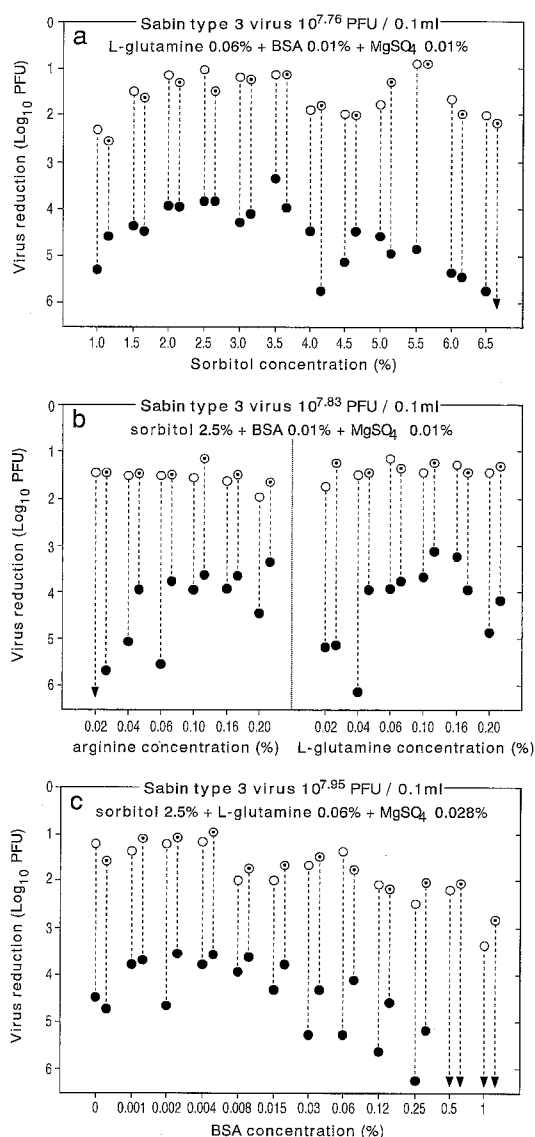


Fig. 5 Effect of combined lyophilizing media on lyophilization and subsequent 45°C incubation of Sabin type 3 virus.

- a: sorbitol (varying concentrations) + glutamine (0.06%) + BSA (0.01%) + MgSO<sub>4</sub> (0.01%) medium.
- b: sorbitol (2.5%) + arginine or glutamine (varying concentrations) + BSA (0.01%) + MgSO<sub>4</sub> (0.01%) medium.
- c: sorbitol (2.5%) + glutamine (0.06%) + BSA (varying concentrations) + MgSO<sub>4</sub> (0.028%) medium.

Lyophilized viruses were reconstituted before (○ or ⊙) and after (●) 45°C incubation for 1 week. Of the two dotted lines shown for each concentration of the substance on the abscissa, the left indicates the experiment using DDW as reconstituting medium and the right the experiment using 10% BC.

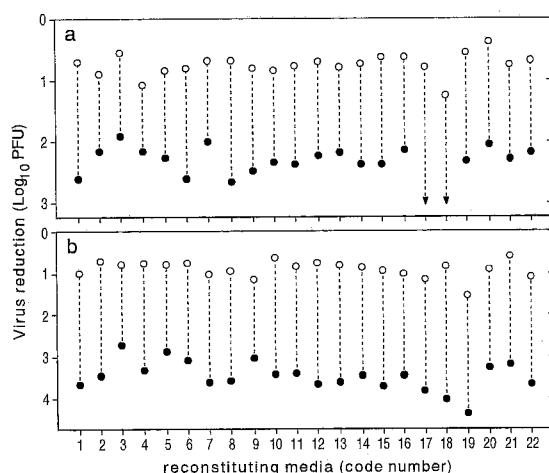


ビン1型および3型ウイルスを、各種の試薬で作成した凍乾後ウイルス溶解液で溶解し、感染価の低下率 ( $\log_{10}$  PFU) を比較した。Fig. 6 には21種類の凍乾後ウイルス溶解液を用いて溶解した凍乾直後及び45°C 1週間加熱後の感染価を示した。

セービン1型ウイルスではペプトン類の中では10%ポリペプトンSの効果が最も優れ、他にEagle MEM (4倍濃度)、5%デキストラン、1M塩化マグネシウム ( $\text{MgCl}_2$ ) などが有効と考えられた (Fig. 6a)。セービン3型ウイルスではペプトン類の中では10%ポリペプトンSが有効で、他に10%グリシン、1M  $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{MgSO}_4$  などに効果が期待された (Fig. 6b)。

### 3・3・2 2剤の混合による凍乾後ウイルス溶解液の作成

凍乾後ウイルス溶解液として最も好成績が得られたポリペプトンSを基本とし、2剤目添加の効果について検討した。先の実験で好成績が得られたEagle MEM、デキストラン、塩化マグネシウム、グリシンの4剤と、



**Fig. 6** Effect of reconstituting media on lyophilization and subsequent 45°C incubation of Sabin type 1 (a) and type 3 (b) viruses. Lyophilized Sabin viruses before (○) and after (●) 45°C incubation for 1 week were dissolved with reconstituting media (No. 1-22) prior to plaque assays.

1. DDW 2. 10% Bactocasitone
3. 10% Polypeptone-S 4. 10% Plypeptone
5. 10% Bactopeptone 6. Hemacell
7. 4 × Eagle MEM 8. 1 × Eagle MEM
9. 10% Glycine 10. 20% Sucrose
11. 20% Sorbitol 12. 20% Mannitol
13. 3.6% Trehalose 14. 20% Glucose
15. 5% Polyethylene Glycol 16. 5% Dextran
17. 5% Ficoll 18. 5% Na-Dextran Sulfate
19. 50% Glycerine 20. 1M  $\text{MgCl}_2$
21. 1M  $\text{MgSO}_4$  22. PBS

さらに感染性の保持効果および甘味料として通常経口ワクチンに含まれている蔗糖を選択し、これらの組合せについてセービン1型および3型ウイルスを用い、凍乾後と凍乾ウイルスの45°C 1週間加熱後の感染価を測定した結果をTable 4に示した。2剤の各組合せについ

**Table 4** Effect of combined reconstituting media on lyophilization and subsequent 45°C incubation of Sabin type 1 and type 3 viruses.

#### a Sabin type 1 virus

	15% Polypeptone-S	30% Sucrose	1M $\text{MgCl}_2$	4 × Eagle MEM	20% Dextran
15% Polypeptone-S	$\frac{0.33^*}{2.66^*}$				
30% Sucrose	$\frac{0.37}{2.15}$	$\frac{0.37}{2.83}$			
1M $\text{MgCl}_2$	$\frac{0.43}{2.28}$	$\frac{0.69}{2.60}$	$\frac{0.83}{2.78}$		
4 × Eagle MEM	$\frac{0.55}{2.63}$	$\frac{0.25}{3.19}$	$\frac{0.88}{3.43}$	$\frac{0.95}{2.83}$	
20% Dextran	$\frac{0.53}{2.60}$	$\frac{0.69}{2.69}$	$\frac{0.25}{2.97}$	$\frac{0.85}{\text{N.D.**}}$	$\frac{0.74}{2.93}$
15% Glycine	$\frac{0.65}{2.37}$				

lyophilizing medium: sorbitol 2.5%+L-glutamine 0.06%+BSA 0.01%

titer before lyophilization:  $10^{5.73}$  PFU/0.1 ml

#### b Sabin type 3 virus

	30% Polypeptone-S	30% Sucrose	1M $\text{MgCl}_2$	4 × Eagle MEM
30% Sucrose	$\frac{0.93^*}{2.79^*}$			
1M $\text{MgCl}_2$	$\frac{0.97}{3.09}$	$\frac{0.89}{3.16}$		
4 × Eagle MEM	$\frac{1.16}{3.19}$	$\frac{1.43}{3.49}$	$\frac{1.71}{3.49}$	
20% Dextran	$\frac{1.23}{3.12}$	$\frac{1.16}{3.37}$	$\frac{1.27}{3.37}$	$\frac{1.57}{3.57}$
30% Glycine			$\frac{1.43}{3.32}$	

lyophilizing medium: sorbitol 2.5%+L-glutamine 0.6%+BSA 0.01%

titer before lyophilization:  $10^{7.97}$  PFU/0.1 ml

Reconstituting medium consisted of a combination of two substances as shown above.

\* Of virus titers obtained with each of the combined media, the numerator shows virus reduction ( $\log_{10}$  PFU) by lyophilization and the denominator virus reduction by lyophilization followed by subsequent 45°C incubation for 1 week.

\*\* Not determined

て、凍乾後の感染価の低下(上段)及びこれを更に45°C 1週間加熱した際の凍乾前ウイルス感染価からの低下(下段)の数値を示した。セービン1型(Table 4a)および3型(Table 4b)両ウイルスについては、特定の基材とポリペプトンS(15%又は30%)との組合せでは、同一基材とポリペプトンS以外の基材との組合せに比し感染価の低下がやや少なく、かつ蔗糖とポリペプトンSとの混合液で特に低下率が低かった。なお、ポリペプトンS(15%)と蔗糖(15%)に更に5%~25%に塩化マグネシウムを加えて効果を検討したが、塩化マグネシウム添加の効果は認められなかった。

### 3・3・3 凍乾後ウイルス溶解液としてのポリペプトンSと蔗糖の濃度の検討

以上の実験結果から、凍乾後ウイルス溶解液としてポリペプトンSと蔗糖の混合液を用いることとした。凍乾したセービン1型および3型ウイルス及びこれらを45°C 1週間加熱したもの種々の濃度のポリペプトンSと蔗糖の混合液に溶解して感染価を測定した(Table 5)。その結果、両型ウイルスとも混合液に溶解した場合には、そのほとんどが蒸留水(すなわちポリペプトンS、蔗糖ともに0%の場合)に比し感染価の保存が良好であったが(特に45°C加熱保存後で明瞭)、最良の結果を示す濃度の組合せを決定することはできなかった。セービン1型の場合(Table 5a)、ポリペプトンS 2%~15%と蔗糖 5%~15%の濃度の組合せが比較的良好であり、これらの濃度範囲においては、2剤の混合液は蔗糖液単独に比し優れ、ポリペプトンS単独とは同程度の効果を示した。セービン3型の場合(Table 5b)も同様にポリペプトンS 2%~15%と蔗糖 5%~15%の組合せが概して良い結果を示し、これらの濃度範囲においては、両剤の混合液はポリペプトンS単独に比し優れ、蔗糖単独とは同程度の効果を示した。従って溶解液作成の容易さ(高濃度液は調製が難しく粘稠で操作が難しい)、投与の際の飲み易さ(ポリペプトンS特有の臭いと味を蔗糖の甘みで抑える)を考慮するとポリペプトンS 5~10%と蔗糖 10~15%程度の組合せが適当と考えられる。

### 3・4 セービンワクチン1, 2, 3型ウイルスの凍乾と長期加熱試験

凍乾前ウイルス溶解液としてソルビトール2.5%+グルタミン0.06%+BSA 0.01%、凍乾後ウイルス溶解液としてポリペプトンS 30%+蔗糖 30%混合液を用い、セービン1, 2および3型ウイルスを同時に凍乾、加熱して力価の変化を観察した(Fig. 7)。セービン各型ウイルスを上記凍乾前ウイルス溶解液にて溶解し、各型

**Table 5** Effect of combined reconstituting media consisting of various concentrations of polypeptone S and sucrose on lyophilization and subsequent 45°C incubation of Sabin type 1 and type 3 viruses.

#### a Sabin type 1 virus

Sucrose	Polypeptone-S				
	30%	15%	5%	2%	0%
30%	0.48*				0.56
	2.08*				2.86
15%		0.40	0.48	0.48	0.58
		2.25	2.15	2.45	2.47
10%		0.47	0.28	0.77	0.36
		2.36	2.02	1.94	2.37
5%		0.26	0.65	0.77	0.54
		2.20	2.34	2.55	2.81
2%		0.38	0.54	0.65	0.84
		2.64	2.64	2.58	2.87
0%	0.50	0.70	0.48	0.54	0.45
	2.21	2.18	2.26	2.62	2.78

lyophilizing medium: sorbitol 2.5%+L-glutamine 0.06%+BSA 0.01%

titer before lyophilization:  $10^{5.88}$  PFU/0.1 ml

#### b Sabin type 3 virus

Sucrose	Polypeptone-S				
	30%	15%	5%	2%	0%
30%	0.87*				0.83
	3.00*				2.74
15%		0.86	0.96	0.94	0.83
		3.23	2.96	2.87	2.90
10%		0.94	0.77	0.86	0.83
		2.98	2.89	2.92	2.99
5%		0.73	0.86	N.D.**	1.10
		2.72	3.04	3.24	3.54
2%		0.68	0.77	0.77	0.89
		3.98	3.57	3.46	3.57
0%	0.91	0.68	0.73	0.68	0.91
	3.31	3.61	3.54	3.24	3.99

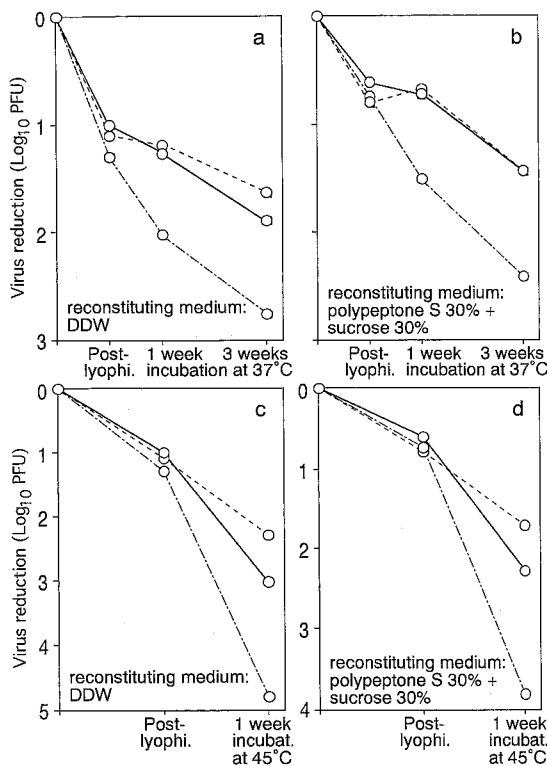
lyophilizing medium: sorbitol 2.5%+L-glutamine 0.06%+BSA 0.01%

titer before lyophilization:  $10^{7.72}$  PFU/0.1 ml

Reconstituting medium consisted of a combination of two substances as shown above.

\* Of virus titers obtained with each of the combined media, the numerator shows virus reduction ( $\log_{10}$  PFU) by lyophilization and the denominator virus reduction by lyophilization followed by subsequent 45°C incubation.

\*\* Not determined



**Fig. 7** Effect of reconstituting media on lyophilization and subsequent incubation at 37°C for 3 weeks (a and b) or 45°C for 1 week (c and d) of three types of Sabin vaccine virus. Lyophilized Sabin type 1 (○—○), type 2 (○---○) and type 3 (○···○) viruses before and 1 week, 2 weeks and 3 weeks after incubation at 37°C were reconstituted with DDW (a) or 30% polypeptone S + 30% sucrose (b). Lyophilized Sabin type 1 (○—○), type 2 (○---○) and type 3 (○···○) viruses before and 1 week after incubation at 45°C were reconstituted with DDW (c) or 30% polypeptone S + 30% sucrose (d). Each of virus titers plotted in the figure indicates the GMT based on titrations of at least three separate samples treated in the same manner.

24 サンプルずつ同時に凍乾を行い、凍乾後および凍乾ウイルスの 37°C 1 週、3 週、および 45°C 1 週間の加熱保存後に凍乾後ウイルス溶解液および再蒸留水で溶解し、各型ウイルスの感染価に対する凍乾前および凍乾後ウイルス溶解液の効果を検討した (Fig. 7)。

ポリペプトン S・蔗糖混合溶解液に溶解復元した場合 (Fig. 7b 及び d)、セービン 1 型では凍乾により 0.6 Log<sub>10</sub> 程度の感染価の低下が見られたが、その後 37°C

1 週間の加熱保存では低下はほとんどなく、37°C 3 週間の加熱で凍乾後に比し 0.9 Log<sub>10</sub> 程度の低下に止まった。一方、凍乾ウイルスの 45°C 1 週間の加熱による感染価の低下は 1.7 Log<sub>10</sub> 程度であった。セービン 2 型についても、凍乾とその後の加熱による感染価の低下はセービン 1 型と略同等で、45°C 1 週間の加熱後の力価の減少は凍乾直後に比べ 0.9 Log<sub>10</sub> で、セービン 1 型以上の耐熱性を示した。セービン 3 型は前 2 者に比し感染力価の低下が著しく、凍乾の過程で 0.7 Log<sub>10</sub>、37°C 1 週間加熱でさらに 0.8 Log<sub>10</sub>、37°C 3 週間では凍乾後に比し 1.7 Log<sub>10</sub> の低下を示した。45°C 1 週間の加熱では、凍乾後の力価より 3 Log<sub>10</sub> 程度低下した。以上の結果を蒸留水で溶解した際の成績 (Fig. 7a 及び c) と比較すると、ウイルスの混合溶解液による溶解が、凍乾及び加熱処理、あるいはそれらの感染価測定の過程で起るウイルス力価の減少を阻止する効果のあることが明らかであった。

### 3.5 反復凍乾処理ウイルスの凍乾感受性

セービン 3 型ウイルスは凍乾とその後の加熱処理に対し最も敏感であった。そこで反復凍乾処理による凍乾耐性ウイルス選択の可能性について検討した。凍乾後の生残ウイルスを初代ミドリザル腎細胞により 1 回増殖したものを 1 回凍乾ウイルスと称し、本ウイルスを凍乾、細胞内増殖したものを 2 回凍乾ウイルス、さらに同様の反復により 3 回凍乾ウイルスおよび 4 回凍乾ウイルスを作成した。次いでこれらのウイルスの凍乾感受性を、凍乾直後、37°C 3 週間および 45°C 1 週間加熱保存後の感染価の測定により検討した。その結果、セービン 3 型親ウイルスおよび 1~4 回凍乾継代ウイルスの間で、凍乾処理およびその後の 37°C または 45°C での保存による感染価の有意な相違は認められなかった (図省略)。

## 4 考 察

1980 年代、EPI に基づくポリオワクチン接種計画が強力に推進されたにも拘わらず、熱帯地域における本ワクチンの効果は日本あるいは欧米諸国におけるそれに比して劣ることが明らかにされた<sup>18)</sup>。その原因として、環境に広く存在する他の病原微生物による腸管内での干渉現象やワクチン被接種小児の低栄養、低免疫能などに加えて、ポリオ生ワクチンの易熱性に起因するワクチンの輸送及び保存期間中の力価の低下が指摘されている。世界各国で用いられている生ポリオワクチンはメーカー毎に有効保存期間を定めている。日本ポリオ研究所のワクチンの有効保存期間は、10°C 以下の保

存で7日間、4°C以下保存で1か月、-20°C保存で1年とされている。他国のセービンワクチンの保存期間もほぼ同様であり本ワクチンの易熱性はよく知られている。Product Development Group for Development of a Thermostable Oral Poliovaccine (PDG, WHO)は、コールドチェーンのない熱帯地域での使用に耐え得る耐熱性ワクチンの開発なしにはポリオの根絶は極めて困難であるとして、耐熱性ポリオワクチン開発の従来の一応の基準(37°C 1週間加熱後の感染価の低下を0.5 log<sub>10</sub>以内とする)よりさらに理想的な基準として「45°C 1週間で同程度の低下を目標とする」ことを提案した<sup>16,19)</sup>。

ポリオウイルスの凍乾に関する研究としては、Kraft, Pollard<sup>12)</sup>らの強毒ポリオウイルス(マウス脳馴化2型MEF1株および3型Leon株のマウス脳乳剤)を用いた試み(1954年)及びNagel *et al.*<sup>13)</sup>の3価不活化ポリオワクチンの凍乾実験(1963年)以外には見あたらない。Kraftらは凍乾時にウイルスを十分低温にしておくこと、及び凍乾用溶液としてペプトン(5%~30%)あるいはチオグリコレート(5%)を用いるか又は凍乾ウイルスを30%ペプトンに復元することにより凍乾による感染価の低下が最も少なく、凍乾ウイルスの40°C 8時間加熱後の感染価の低下を1.4 log<sub>10</sub>程度に止め得ると報告した。Nagelらは凍乾した不活化ウイルス抗原を緩衝作用のある溶解液で復元することの重要性を指摘した。ポリオウイルスに関するその後の研究は、加熱による感染性の失活がウイルス蛋白の構造の変化によることを明らかにした<sup>20)</sup>。従来から高濃度のマグネシウムイオンが本ウイルスの耐熱性を高めることが知られていたが、その作用機作は不明であった。Dorvalら<sup>21)</sup>は、加熱により生ずるウイルス蛋白分子の不安定な荷電残基にマグネシウムイオンが結合することにより蛋白分子構造の安定性が保持されるという考えを提起し、これはエンテロウイルスに一般的な機作であるとしている。さらに彼らは、myristic acidなどの脂肪酸が45°C 30分加熱に対して強毒ポリオウイルスの耐熱性を高めるとし、燐酸緩衝液中で見られた3 log<sub>10</sub>の感染価の低下をmyristic acid液中では0.5 log<sub>10</sub>以下にまで減少させたとする成績を示した。彼らの成績ではC6~C16の脂肪酸が最も優れた感染性保護効果を示した。さらに、透析平衡に基づく1ウイルス粒子当たりのmyristic acidの結合が4分子であることから、myristic acidによるポリオウイルス耐熱性向上の機序が、粒子表面に位置しuncoatingへの関与が推定されているhydrophobic pocket(粒子当たり60個存在)の保護と

は異なる機序に基づく可能性を示唆した。Uncoatingにおけるhydrophobic pocketの重要性はこの領域に変異を有するウイルスが親ウイルスに比して熱耐性を獲得することからも理解される<sup>22)</sup>。そこで、このpocket領域との反応によりuncoatingを阻止すると考えられる各種のウイルス安定剤(isoxazoles(WIN化合物), pyridazinamines等)<sup>23)</sup>を用いてウイルス材料の耐熱化を計る試み<sup>9)</sup>もなされているが、未だ実用に供し得る段階には至っていない。最近に到り、さらにMgCl<sub>2</sub>添加重水(MgCl<sub>2</sub>-D<sub>2</sub>O)の耐熱性向上効果が報告されている<sup>24)</sup>。

著者は現在の性能の向上した凍乾機を使用し、凍乾前溶解液および凍乾後溶解液の組成を工夫することで、熱帯地域で使用可能な凍乾セービン生ワクチンの開発が可能ではないかと考えて実験を行ってきた。従来より凍乾の際の安定剤として広く用いられている種々の物質について検討した結果、成績に示したように凍乾過程およびその後の加熱に安定なウイルス溶解液の組成を見出すことができた。即ち、凍乾の際のウイルス溶解液として、各種糖類、アミノ酸、蛋白、無機塩類等の単独または種々の組合せの混合液の中から、最終的には1, 2, 3型ウイルスに共通して、ソルビトール2.5%+グルタミン(またはアルギニン)0.06%~1.0%+BSA 0.01%混合液の効果が優れていると判断した。グルタミンと類似構造を有するアルギニンについては、その優劣について今後の検討が必要と考えられる。凍乾後のウイルス溶解液として選出されたポリペプトンSと蔗糖の混合液については、ポリペプトンの溶解性(高濃度では調製が難しく粘稠で操作が困難である)およびその経口的適用(ポリペプトンSには特有の臭いと味がある)などを考慮するとポリペプトンS 5%~10%+蔗糖 10%~15%の混合液が適当で、実験結果からも高濃度のポリペプトンを使用する必要はないと考えられた。

以上の条件の下で、セービンワクチンウイルスの凍乾と加熱保存を行った場合、処理前-凍乾処理後-37°C 1週間加熱-37°C 3週間保存の各段階での感染価の低下、および凍乾直後と45°C 1週間加熱後の感染価の差は、1型ウイルスではそれぞれ0.5~0.7 Log<sub>10</sub>, 0.2~0.4 Log<sub>10</sub>, 0.6~0.8 Log<sub>10</sub> および1.6~1.9 Log<sub>10</sub>程度であった。2型ウイルスでは1型と同等以上の耐熱性を示し、それぞれ0.6~0.7 Log<sub>10</sub>, 0.1~0.2 Log<sub>10</sub>, 0.5~0.6 Log<sub>10</sub> および0.8~1.2 Log<sub>10</sub>程度、3型ウイルスではそれぞれ0.7~0.8 Log<sub>10</sub>, 0.7~0.9 Log<sub>10</sub>, 0.9~1.0 Log<sub>10</sub> および2.0~3.0 Log<sub>10</sub>程度で

あった。以上の凍乾ワクチンウイルスの耐熱性は1, 2, 3型共に従来の本ワクチンの耐熱性の基準を十分満たすものと考えられたが, 45°C加熱耐熱性に関するより理想的な基準を充たすことはできなかった。また, 1型および2型に比し3型の45°C加熱試験での成績が劣るため, 3型セービンウイルスについて4回の凍乾とこれに続く細胞内増殖の反復により, 凍乾処理に耐性のウイルスの選択を試みたが, 不成功に終わった。

本研究における実験では, 同一ウイルス液を用いた場合でも, 凍乾サンプルにより凍乾処理前後での感染価の低下および加熱処理後の感染価の低下に可成りのばらつきが認められている。これらの“ばらつき”の原因には大別して, 1) 異なる凍乾実験間のばらつき(実験により凍乾の仕上りが異なる), 2) 同一凍乾実験過程で生ずるサンプル間のばらつき(各バイアルの置かれた棚板上の位置などによる), 3) 感染価測定の際の測定誤差によるばらつき, の可能性が考えられる。本研究では, “ばらつき”があったとしても検討した変量(図中横軸の変量)相互間での優劣の比較には本質的に大きな影響を与えないものと考えて研究を進め, 凍乾前ウイルス溶解液および凍乾後ウイルス溶解液の組成を決定した。今後は, 上記の“ばらつき”を最小限に抑える工夫と, そのような条件下での上記のウイルス溶解液の効果の確認が必要と考えられる。

## 5 要 訳

ポリオの世界的根絶を達成するためには, 熱帯諸国の環境温度に耐える耐熱ワクチンの開発が急務である。我々はこの目的のためにセービン1, 2, 3型ワクチンウイルスの凍結乾燥(凍乾)について検討した。

1. 凍乾用ウイルス溶解液として, ソルビトール2.5%+グルタミン(又はアルギニン)0.06%~0.1%+BSA 0.01%の混合液の効果が優れていた。

2. 凍乾後のウイルス溶解液にはポリペプトンS 5~10%+蔗糖10%~15%の混合液が適当と判断された。

3. 以上の溶解液を用いても3型ワクチンウイルスは他の2種に比し著しく熱感受性であった。

4. 凍乾とこれに続く細胞内増殖の反復により, 凍乾処理に耐性のウイルスの選択を試みたが, そのようなウイルスを得ることはできなかった。

## 謝 辞

本研究は「耐熱性ポリオワクチンの開発研究(代表者 日本ポリオ研究所 橋爪 壮理事長)」の援助を受

けた。

## 参考文献

1. Lemon SM, Robertson SE. Global eradication of poliomyelitis: Recent progress, future prospect, and new research priorities. *Prog Med Virol* 1991, 138: 42-55.
2. Sabin AB, Boulger LR. History of Sabin attenuated poliovirus oral live vaccine strains. *J Biol Stand* 1973, 1: 115-118.
3. Sabin AB, Oral poliovirus vaccine: History of its development and use and current challenge to eliminate poliomyelitis from the world. *J Infect Dis* 1985, 151: 420-436.
4. Shimojo H. Poliomyelitis control in Japan. *Rev Infect Dis* 1984, 6 Suppl 2: S427-S430.
5. Forty-first World Health Assembly. Global eradication of poliomyelitis by the year 2000. Geneva. World Health Organization, 1988, WHA41. 28
6. Galazka A. Stability of vaccines. Geneva, World Health Organization, 1989, EPI/Gen/89. 8
7. Cheyne J. Vaccine delivery management. *Rev Infect Dis* 1989, 11 Suppl 3: S617-S622.
8. Mirchamsy H, Shafiyi A, Mahinpour M, Nazari P. Stabilizing effect of magnesium chloride and sucrose on Sabin live polio vaccine. *Dev Biol Stand* 1978, 41: 255-257
9. Rombaut B., Andries K, Boeyé A. A comparison of WIN 5171 and R78206 as stabilizer of poliovirion and procapsids. *J Gen Virol* 1991, 72: 2153-2157
10. 国立予防衛生研究所学会編 ワクチンハンドブック, 東京, 丸善, 1994年
11. Hilleman MR. Improving the heat stability of vaccines: problems, needs, and approaches. *Rev Infect Dis* 1989, 11 Suppl 3: S613-S616.
12. Kraft LM, Pollard EC. Lyophilization of poliomyelitis virus. Heat inactivation of dry MEFl virus. *Proc Soc Exp Biol Med* 1954, 86: 306-309.
13. Nagel J., Hekker AC, Hofman B, Cohen H. Some experiments on freeze-drying of inactivated poliomyelitis-vaccines. *Arch Ges Virusforsch* 1963, 12: 718-720.
14. 土井 壤, 檜 水 宏, 安部 忍, 佐藤 啓 史, 堀 江 均, 橋 爪 壮. 経口生ポリオワクチン製造用シードウイルスについて. *臨床とウイルス*. 1993, 21: 123-131.
15. Urasawa S, Urasawa T, Kanamitsu M. Further studies of specificity of antibodies contained in antiserum against poliovirus. *Jpn J Microbiol* 1976, 20: 11-16.

16. WHO. WHO informal consultation on improvement of thermostability of oral poliovirus vaccines. WHO meeting report, geneva, 1991.
  17. Walis C, Melnick JL. Different effects of  $MgCl_2$  and  $MgSO_4$  on the thermostability of viruses. *Virology* 1965, 26: 694-699.
  18. Hovi T. Remaining problems before eradication of poliomyelitis can be accomplished. *Prog Med Virol* 1991, 38: 69-95.
  19. Product development group on thermostable oral polio vaccine. 1992-1993 WHO Geneva, Children's Vaccine Initiative report: 7-10.
  20. Dissociation of poliovirus-Heat degradation. In: Koch F, Koch G. *The Molecular Biology of Poliovirus*. Springer-Verlag 1985, 86-89.
  21. Dorval BL, Chow M, Kibanov AM. Stabilization of poliovirus against heat inactivation. *Biochem. Biophys Res Commun* 1989, 159: 1177-1183.
  22. Minor PD, Dunn G, Evans DM, Magrath DJ, John A, Howlett J, Phillips AA, Westrop G, Wareham K, Almond JW, Hogle JM. The temperature sensitivity of the Sabin type 3 vaccine strain of poliovirus: molecular and structural effects of a mutation in the capsid protein VP3. *J Gen Virol* 1989, 70: 1117-1123.
  23. Badger J, Minor I, Kremer MJ, Oliveira MA, Smith TJ, Griffith JP, Guerin DMA, Krishnaswamy S, Luo M, Rossmann MG, McKinlay MA, Diana GD, Dutko FJ, Fancher M, Rueckert RR, Heinz BA. Structural analysis of a series of antiviral agents complexed with human rhinovirus 14. *Proc Natl Acad Sci* 1988, 85: 3304-3308.
  24. Wu R, Georgescu M-M, Delpeyroux F, Guillot S, Balanant J, Simpson K, Crainic R. Thermostabilization of live virus vaccines by heavy water ( $D_2O$ ). *Vaccine* 1995, 13: 1058-1063.
- 
- 別刷請求先：  
(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目  
札幌医科大学医学部衛生学講座 浦沢正三